



-2- * -

C12Q1/6834

... Numéro de publication internationale: WO 90/15881

(43) Date de publication internationale: 27 décembre 1990 (27.12.90)

C12Q 1/68, G01N 33/531

A1

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00410

(22) Date de dépôt international: 12 juin 1990 (12.06.90)

(30) Données relatives à la priorité:

89/07710	-	12 juin 1989 (12.06.89)	FR
89/10643		8 août 1989 (08.08.89)	FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; RN 306, F-91400 Saclay (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TEOULE, Robert [FR/FR]; 52, rue Thiers, F-38000 Grenoble (FR). LIVACHE, Thierry [FR/FR]; 20, rue Claude-Kogan, F-38000 Grenoble (FR). FOUQUE, Brigitte [FR/FR]; 51, avenue Louis-Armand, F-38180 Seyssins (FR). SAUVAIGO, Sylvie [FR/FR]; 28, rue Emile-Gueymard, F-38000 Grenoble (FR).

(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen)*, DK (brevet européen), ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), NO, SE (brevet européen), SU, US.

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

- C12Q1/6832

(54) Title: METHOD FOR DETECTING SPECIFIC NUCLEIC ACID SEQUENCES AND APPLICATIONS OF SAME

(54) Titre: PROCÉDE DE DETECTION DE SEQUENCES SPECIFIQUES D'ACIDES NUCLEIQUES ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract

A method for detecting specific nucleic acid sequences (a single sequence and/or a mixture of nucleic acid sequences) which are present in a biological sample, comprising at least one enzymatic amplification. Detection is carried out, after placing the biological samples in a solution in order to extract the nucleic acid, by enrichment with target sequences by putting the biological samples into contact with at least one pair of appropriate triggers, followed by at least one appropriate dilution of the obtained enrichment amplifying solution, and by putting a fraction of this solution into contact with at least one pair of triggers, followed by the detection of the obtained double-strand target nucleic acid copies. Applications in the diagnosis of genetic, infectious and tumoral diseases, in checking biological samples and in cell typing etc.

(57) Abrégé

Procédé de détection de séquences spécifiques d'acide(s) nucléique(s) (séquence unique et/ou mélange de séquences d'acides nucléiques) présente(s) dans un échantillon biologique, comprenant au moins une amplification enzymatique. La détection est réalisée, après mise en solution des échantillons biologiques pour en extraire le/lès acides nucléiques, par enrichissement en séquences cibles par mise en contact des échantillons biologiques avec au moins une paire d'amorces appropriées, suivie par au moins une dilution appropriée de la solution d'amplification d'enrichissement obtenue, puis par mise en contact d'une fraction de cette solution avec au moins une paire d'amorces, suivie de la détection des copies d'acide nucléique cible double brin obtenues. Applications à la détection de maladies génétiques, infectieuses, tumorales, au contrôle des échantillons biologiques, au typage cellulaire, etc.

HPV 16, 18, HIV

± M nested primers

= C

P

HaeIII

Dilution PCR to diminish false positives
using 2 sets of amplification sequential
apo detection by
Soln. fluorescence with
intercalating dyes!

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brsil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	LU	Luxembourg	TC	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

PROCEDE DE DETECTION DE SEQUENCES SPECIFIQUES D'ACIDES NUCLEIQUES ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de détection de faibles quantités d'acides nucléiques obtenus par amplification, ainsi qu'à ses applications.

L'une des premières méthodes d'amplification décrites, est la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), développée par SAIKI R. et al. (Science, 1985, 10 230, 1350). Cette technique permet notamment d'amplifier des séquences d'ADN double brin et est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase, laquelle enzyme est capable de copier un brin d'ADN, utilisé comme matrice, en un brin complémentaire par élongation à partir de l'extrémité 3' OH libre d'une amorce oligonucléotidique.

La technique PCR consiste à effectuer n cycles successifs d'amplification, au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN double brin qu'elles encadrent.

Un cycle d'amplification est composé de trois étapes permettant de réaliser successivement la dénaturation de l'ADN (95°C), l'hybridation des amorces (37-55°C) et l'extension des brins d'ADN par une ADN polymérase.

Les bases technologiques de la PCR reposent sur deux points fondamentaux :

- l'utilisation de deux amorces oligonucléotidiques, l'une complémentaire du brin ADN+, l'autre du brin ADN- et dont les extrémités 3' sont en regard;
- l'utilisation répétitive de l'activité d'une ADN polymérase appropriée.

La PCR permet alors l'utilisation, dans des conditions adéquates, de toutes les séquences néosynthétisées au cycle n, comme matrices pour l'ADN polymérase au cycle (n+1). Il en résulte une amplification exponentielle du nombre de séquences d'acides nucléiques cibles, en fonction du nombre de cycles, conformément à la courbe

d'amplification qui comprend une phase exponentielle où la quantité Q de séquences cibles obtenues peut être reliée à la quantité Q₀ de séquences cibles initiales, au facteur d'amplification x et au nombre de cycles n, par la formule suivante : $Q = Q_0 (1 + x)^n$.

La PCR permet ainsi d'amplifier, de manière exponentielle, des séquences d'acides nucléiques dites cibles, des milliers de fois.

Cette technique d'amplification est plus particulièrement décrite dans la Demande de Brevet européen CETUS 201 184, qui spécifie notamment que les deux amorces oligonucléotidiques mises en oeuvre dans la PCR sont de préférence simple brin et doivent être suffisamment longues pour amorcer la synthèse du produit d'extension en présence de l'ADN polymérase.

Un certain nombre d'améliorations ou de perfectionnements à cette technique ont été proposés et notamment, pour éviter l'addition d'enzymes à chaque cycle, une ADN polymérase pouvant résister à 100°C, la Taq polymérase, décrite dans la Demande de Brevet européen CETUS 258 017, est ajoutée dès le début du procédé et permet de réaliser un nombre important de cycles d'amplification consécutifs. La Taq polymérase a permis d'une part d'automatiser le procédé d'amplification et d'autre part d'augmenter la spécificité de l'amplification.

La PCR permet ainsi d'obtenir, sans clonage, une amplification considérable d'une séquence nucléique, dite séquence cible, donc un énorme gain en sensibilité. La séquence cible amplifiée est ensuite directement accessible à différents procédés d'analyse tel que le procédé de dot-blot, l'électrophorèse ou le séquençage. Deux Demandes de Brevet (Demandes de Brevet européen CETUS n° 200 362 et n° 229 701) décrivent plus particulièrement l'association amplification-hybridation pour la

détection d'une séquence d'acide nucléique recherchée dans un échantillon.

Depuis, des variantes et/ou des perfectionnements, pour rendre l'étape de détection des séquences amplifiées plus aisée, ont été proposés et concernent notamment les amorces et/ou les sondes utilisées.

L'un de ces perfectionnements est l'utilisation de deux sondes différentes dont l'une, marquée, est dite sonde de détection et dont l'autre comprend un fragment ayant une affinité pour un autre composant et est dite sonde de capture [Brevet britannique 2 69 403, Brevet français 85 19394, KOHNE D. (American Clin. Review, nov. 1986), Brevet US 4 486 539, Demandes de Brevet européen 70685 et 70687].

En variante, ce sont les amorces elles-mêmes qui sont modifiées, de manière à permettre la capture de l'hybride formé (Demande de Brevet français 88 03107, Demande de Brevet européen MOLECULAR DIAGNOSIS Inc., n° 297 379).

Un autre de ces perfectionnements est par la méthode décrite dans la Demande de Brevet européen Syntex, n° 300 796, qui propose une variante de la PCR qui augmente la sensibilité de cette dernière, notamment en présence de quantités très faibles d'acide nucléique sans en augmenter toutefois la spécificité.

Cependant, l'utilisation en routine de la PCR, a fait apparaître un inconvénient important, lié à son extrême sensibilité, à savoir l'émergence de faux-positifs, qui se sont révélés être liés, après une analyse soigneuse des résultats, essentiellement à une contamination de l'échantillon à analyser par des séquences homologues.

Un certain nombre d'articles, parus depuis environ deux ans, décrivent de tels cas de contaminations

et proposent des moyens pour les résoudre :

- Y.M.D. LO et al., dans un article paru dans Lancet (1988, ii, 679), font apparaître cet inconvénient de la réaction de polymérisation en chaîne, dû à sa sensibilité et, pour pallier cet inconvénient important, préconisent de prendre un soin particulier dans la préparation de la matrice d'ADN avant l'amplification.

- R.A. GIBBS et al., dans un article paru dans Genes & Development, 1989, 3, 1095-1098, prodiguent les conseils suivants : isoler tous les réactifs utilisés pour la mise en oeuvre de la PCR, des équipements utilisés pour analyser les produits obtenus ; utiliser des bouchons à vis et même aller jusqu'à congeler les contenus, avant d'effectuer la réaction finale, afin d'éviter la formation d'aérosols ; limiter le nombre de cycles d'amplification au minimum, à la fois pour réduire le risque d'amplifier de petites quantités de contaminants déjà présents et pour réduire la quantité totale de produits de réaction et disposer de jeux de pipettes différents pour chaque tâche.

- G. SARKAR et al., dans un article paru dans Nature, 1990, 343, 27, proposent, pour éviter la contamination, de traiter l'échantillon aux rayons UV, avant d'ajouter la matrice d'ADN à amplifier.

- S. KWOK et al., dans un article paru dans Nature, 1989, 339, 237-238, proposent un certain nombre de "bonnes pratiques de laboratoire" pour contrôler et pour éviter la contamination : isoler physiquement les préparations et les produits pour PCR (pièces séparées, rayons UV...) ; autoclaver les tampons utilisés ; diviser les réactifs en petits échantillons afin d'éviter un pipetage répété ; utiliser des gants de protection ; éviter les projections ; utiliser des pipettes ne provoquant l'apparition d'aérosols ; etc...

Cependant, les suggestions proposées par les différents Auteurs précités, pour éviter la contamina-

tion, n'envisagent en aucun cas le problème des faux-positifs dû à l'amplification de séquences hétérologues et/ou à la présence de débris cellulaires.

De telles séquences hétérologues, différentes des séquences cibles à détecter, mais cependant de structures suffisamment proches pour entraîner une hybridation imparfaite entre les amorces spécifiques des séquences cibles à détecter et ces séquences hétérologues, sont amplifiées de manière exponentielle comme les séquences cibles, lors de la PCR.

En effet, aucune des méthodes d'amplification et/ou de détection de séquences spécifiques d'acides nucléiques de l'Art antérieur, qui sont les seules à être aisément automatisables, ne permet :

1. d'éliminer les séquences hétérologues amplifiées exponentiellement lors de la PCR, conséquence directe de l'intégration physique des amorces dans les brins néosynthétisés, l'amplification de ces séquences hétérologues conduisant à l'émergence de faux positifs ;
et/ou

2. de réaliser une détection d'acide nucléique en phase homogène, c'est-à-dire ne nécessitant ni séparation sur gel d'électrophorèse, ni fixation sur un support solide de capture, ni utilisation d'amorces nucléotidiques modifiées, ni une étape d'hybridation avec une sonde de détection.

C'est pourquoi, la Demanderesse s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un procédé de détection tant qualitatif, semi-quantitatif que quantitatif et d'identification de faibles quantités d'acides nucléiques par amplification, notamment en phase homogène, qui répond mieux aux nécessités de la pratique que les procédés de l'Art antérieur, notamment en ce qu'il est facile à automatiser, spécifique, sensible, rapide et économique et en ce que la présence de séquences hétéro-

analogues et/ou de débris cellulaires, n'a pratiquement pas d'influence sur ladite détection.

La présente invention a pour objet un procédé de détection de séquences spécifiques d'acide(s) nucléique(s) (séquence unique et/ou mélange de séquences d'acides nucléiques) présente(s) dans un échantillon biologique, comprenant au moins une amplification enzymatique, caractérisé en ce qu'après mise en solution appropriée de l'échantillon biologique pour extraire le/les acides nucléiques, ledit procédé comprend la détection d'une séquence d'acide nucléique ou d'un mélange de séquences à l'aide des étapes suivantes :

(1) une étape d'enrichissement en séquence(s) cibles(s) par :

15 (a) mise en contact de l'échantillon biologique mis en solution, avec au moins une paire d'amorces appropriées, pour amplifier au moins un fragment de ladite/desdites séquences d'acide nucléique cible, lesdites amorces s'hybridant à ladite/lesdites séquences cibles et permettant d'obtenir une solution d'amplification d'enrichissement ; et

(b) au moins une dilution appropriée de la solution d'amplification d'enrichissement obtenue en (a) ;

25 (2) une étape de détection des séquences cibles amplifiées obtenues, par :

(c) mise en contact d'une fraction de la solution d'enrichissement obtenue en (b) avec au moins une paire d'amorces dont au moins l'une des séquences est incluse dans la séquence cible amplifiée en (a) ; et

30 (d) détection des copies d'acide nucléique cible double brin obtenues en (c), par tout moyen approprié.

On désignera ci-après cette dernière amplification sous le nom de "deuxième série d'amplifications".

Conformément à l'invention, les étapes (a) et 35 (b) sont répétées au moins une fois.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de l'invention, la dilution de l'étape (b) est comprise entre $1/50e$ et $1/100\ 000e$.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, la dilution de l'étape (b) est comprise entre $1/50e$ et $1/50\ 000e$.

Selon une modalité avantageuse de cette disposition, la dilution de l'étape (b) est comprise entre $1/50e$ et $1/10\ 000e$, de préférence entre $1/200e$ et $1/5\ 000e$.

Cette dilution permet d'initialiser l'amplification de détection à partir d'un matériel biologique purifié et ayant les propriétés suivantes :

- il est, d'une part, enrichi en séquences cibles et
- il est, d'autre part, appauvri en séquences "parasites" indésirées, à savoir en amorces non de l'étape (a), en séquences hétérologues, en acide nucléique total par rapport à l'échantillon biologique initial et en débris cellulaires.

Le fait que les amorces non utilisées de l'étape (a) sont diluées, a l'avantage d'éviter une compétition entre les amorces de l'étape (a) et les amorces de l'étape (c), au moment de la deuxième série d'amplifications. De plus, ceci permet d'utiliser moins d'amorces lors de la deuxième série d'amplifications et d'obtenir un meilleur rendement d'incorporation de ces dernières. Ceci présente un avantage important, car les amorces de l'amplification de détection sont généralement coûteuses et plus difficiles à synthétiser.

Cet enrichissement en séquences cibles par dilution de la solution d'amplification de l'étape (a) permet de mettre les séquences hétérologues qui provoquent des faux démarrages de lecture par hybridation fautive et les débris cellulaires, dans des conditions peu propices

à leur amplification lors de la deuxième série d'amplifications et lors de la détection.

Le procédé conforme à l'invention a notamment pour avantage d'augmenter la spécificité du dosage en abaissant la quantité d'acide nucléique résiduaire et des séquences hétérologues diverses provenant du prélèvement biologique.

Conformément à l'invention, les amorces de l'étape (a) sont des séquences nucléotidiques simple brin (amorce simple (As)), qui s'hybrident à une séquence cible.

De telles amorces peuvent éventuellement être modifiées. Ceci permet d'obtenir le cas échéant, soit une amorce de capture, soit une amorce de détection.

Egalement conformément à l'invention, les amorces de l'étape (c) sont des paires choisies dans le groupe qui comprend les paires : amorce modifiée par un système de capture-amorce modifiée par un système de détection (Ac-Ad), les paires amorce simple-amorce simple (As1-As2), les paires amorce simple-amorce modifiée par un système de capture (As1-Ac), les paires amorce simple-amorce modifiée par un système de détection (As1-Ad).

On entend par amorce de capture (Ac), une séquence d'acide nucléique simple brin modifiée notamment par au moins une moitié de paire d'affinité et qui s'hybride à une séquence cible ; par exemple, à une extrémité de la chaîne oligonucléotidique une ou plusieurs biotines peuvent être fixées. L'amorce de capture peut également être un oligonucléotide branché.

On entend par amorce de détection (Ad), une séquence d'acide nucléique simple brin modifiée par un système de détection et qui s'hybride à une séquence cible ; par exemple, l'oligonucléotide peut être marqué en son extrémité 5' par un phosphore 32.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux de l'invention, la quantité d'amorces utilisée au

cours de l'étape (c) (deuxième série d'amplifications) est nettement inférieure à la quantité d'amorces utilisée au cours de l'étape (a).

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, la quantité d'amorces utilisée au cours de l'étape (c) est au moins cinq fois plus faible que la quantité d'amorces utilisée au cours de l'étape (a).

Le nombre de cycles de la deuxième série d'amplifications est notamment choisi en fonction de la dilution et de la nature de l'échantillon, de façon à conférer à cette deuxième série d'amplifications, un caractère exponentiel.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux de l'invention, lorsque la paire d'amorces de l'étape (c) contient une amorce de capture, l'étape de détection (2) comprend :

(d) la mise en contact de la solution d'amplification de détection avec un support approprié qui capte les fragments d'acides nucléiques porteurs de l'amorce de capture (Ac) intégrée ; et

(e) la révélation des copies d'acide nucléique cible double brin retenues sur ledit support, par tout moyen approprié.

Cette révélation peut être réalisée soit à l'aide d'une sonde de détection (amorce de détection ou hybridation ultérieure avec une sonde marquée de manière appropriée), soit à l'aide

Dans un tel mode de mise en oeuvre, le système de capture est avantageusement une moitié de paire d'affinité. Un tel système permettra à l'oligonucléotide de se fixer sur le support possédant l'autre moitié de la paire d'affinité.

On peut citer notamment comme paires d'affinité, les paires biotine-avidine ou streptavidine, dérivé de métal lourd-groupe thio, divers homopolynucléo-

ptides comme poly dG-poly dC, poly dA-poly dT et poly dA-poly dU ainsi que divers oligonucléotides de séquences spécifiques comme dans le cas, par exemple des amorces branchées et les paires antigène-anticorps. D'autres paires de composants peuvent également être utilisées si elles présentent une affinité assez forte pour permettre la liaison spécifique des amorces de capture (Ac) incorporées dans les copies de l'acide nucléique cible au support solide ; les ligands et les conjugués peuvent être parties d'une paire d'affinité.

Le système de révélation est avantageusement choisi dans le groupe qui comprend les isotopes (^{125}I , ^{35}S , ^{32}P), les fluorophores, un système fluorescent de type lanthanide, un système enzymatique colorimétrique (phosphatase alcaline, peroxydase), un système enzymatique fluorimétrique, luminescent, bioluminescent ou électrochimique et les composés qui interagissent avec un acide nucléique double brin, notamment une matière colorante ou un agent intercalant.

Selon une disposition de ce mode de mise en oeuvre, lorsqu'une amorce de détection (Ad) est intégrée dans un brin d'acide nucléique cible, au cours de l'étape (c), la détection de l'étape (e) est réalisée à l'aide de ladite amorce de détection (Ad).

Selon une autre disposition de ce mode de mise en oeuvre, lorsqu'une amorce simple (As) est intégrée dans un brin au cours de l'étape (c), la révélation de l'étape (e) est réalisée soit par hybridation des copies d'acide nucléique cible double brin retenues sur le support avec une sonde de détection appropriée, soit par mise en contact avec un composé qui interagit avec l'acide nucléique double brin cible, notamment une matière colorante ou un agent intercalant apte à produire des modifications spectrales, puis détection desdites modifications spectrales du composé qui interagit avec l'acide nucléique double brin, par tout moyen approprié.

A Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, lorsque la paire d'amorces de l'étape (c) ne contient pas d'amorce de capture, l'étape de détection (2) comprend :

5 (d) la révélation directe en phase homogène liquide des dites séquences cibles amplifiées, par mise en contact des acides nucléiques double brin, obtenus après les étapes (a), (b) et (c) définies ci-dessus, soit avec une sonde de détection appropriée, soit avec un composé qui

10 interagit avec un acide nucléique double brin, notamment une matière colorante ou un agent intercalant apte à produire des modifications spectrales puis détection des dites modifications spectrales du composé qui interagit avec l'acide nucléique double brin, par tout moyen appro-

15 prié.

✓ Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, ledit composé est choisi parmi les substances présentant une modification physico-chimique après liaison avec l'ADN double brin.

20 On peut citer à titre d'exemples non limitatifs de tels composés, le 4',6-diamidino-2-phénylindole-2 (DAPI), le bisbenzimidazole, l'éthidium, la 9-aminoacridine, la proflavine, la quinacrine, la chloroquine, la lucanthone, l'hycanthone, la tilorone, le mAMSA, la daunomycine,

25 l'adriamycine, l'actinomycine D, la 9-OH N-méthyl-ellipticine, la mithoxanthrone, la bléomycine, l'échinomycine, la ditercaline et les dérivés de ces composés, l'HOECHST 33 ainsi que les nucléotides modifiés de manière appropriée.

30 Selon une modalité avantageuse de cette disposition, le composé propre à produire des modifications spectrales est un agent intercalant fluorescent tel que, notamment, le bromure d'éthidium ou un bis-benzimidazole tel que l'HOECHST 33-258.

35 Un tel mode de mise en oeuvre a l'avantage de ne nécessiter qu'une mesure directe de l'acide nucléique

double brin marqué total présent dans la solution pour caractériser la séquence recherchée.

Un tel mode de mise en oeuvre a, en outre, l'avantage d'éliminer les réactions de compétition qui se produisent dans les procédés de l'Art antérieur nécessitant une fixation sur un support du produit d'extension double brin obtenu pour la détection de l'acide nucléique.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les dilutions successives d'un ADN à tester, et notamment d'un ADN viral à tester, sont soumises à une première série d'amplifications dans un volume convenable contenant au moins deux séquences cibles propres à servir de matrices, les quatres désoxyribonucléosides triphosphates, une quantité appropriée de Taq DNA polymérase, dans une solution tampon appropriée à pH 8,3 contenant une faible quantité (de l'ordre de 0,01 % p/v) de gélatine, les produits de la première série d'amplifications étant ensuite soumis à une deuxième étape de dilution, puis à une deuxième série d'amplifications dans un milieu d'amplifications qui est avantageusement similaire à celui mis en oeuvre dans la première série d'amplifications et qui contient au moins deux séquences cibles propres à servir de matrices, après quoi le composé propre à produire des modifications spectrales est ajouté à la solution d'amplifications obtenue à la suite de la deuxième série d'amplifications pour révéler l'ADN viral double brin éventuellement présent dans les solutions.

Le procédé conforme à l'invention présente un certain nombre d'avantages sur les procédés de l'Art antérieur :

- une spécificité accrue ;
- une diminution du bruit de fond ;
- une sensibilité accrue, dans la mesure où l'on dilue fortement l'échantillon après l'amplification

d'enrichissement ; en effet, cette forte dilution permet :

d'être le plus souvent en phase exponentielle de l'amplification uniquement pour les séquences cibles, c'est-à-dire lorsque la quantité Q de séquences cibles obtenues peut être reliée au facteur d'amplification x et au nombre des cycles n par la formule $Q = Q_0 (1 + x)^n$;

d'avoir un rapport séquences cibles/séquences non spécifiques nettement supérieur à 1 dès le début de l'amplification de détection ;

de diminuer les réactions de compétition liées aux produits d'extension des acides nucléiques hétérologues et aux composants présents dans le milieu biologique (débris cellulaires, protéines, biotine naturelle, acide nucléique total initial...).

Le procédé conforme à l'invention permet également de procéder, au cours de l'amplification de détection et ce en même temps et dans le même tube à essai, à l'amplification de détection de plusieurs séquences cibles à condition d'utiliser comme amorce de capture des oligonucléotides branchés. Les duplex comportant des oligonucléotides branchés ont un brin d'ADN monocaténaire libre. Ce brin libre d'ADN simple brin permet de réaliser à l'aide d'un oligonucléotide complémentaire attaché à un support, une fixation sélective.

Il faut en outre souligner que la dilution effectuée après la première amplification permet de travailler avec une concentration en amorces assez faible pour éliminer l'incidence du phénomène de dimérisation et d'amplification des amorces qui conduirait à un signal parasite ; de plus, la dilution permet d'utiliser moins d'amorces et donc d'avoir une meilleure spécificité dans la phase de révélation de l'amplification de détection.

Le procédé conforme à l'invention est notamment applicable à la détection des maladies génétiques,

des maladies infectieuses (virus, parasites, champignons, bactéries...) et des maladies tumorales tant humaines, animales que végétales, au contrôle des échantillons biologiques ainsi qu'au typage cellulaire.

5 La présente invention a, en outre, pour objet, un coffret, kit ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'outre des quantités utiles de tampons et de réactifs appropriés pour la mise en oeuvre de
10 ladite détection, il comprend au moins :

- des doses appropriées d'au moins une première paire d'amorces appropriées, pour la réalisation de l'étape (a) dudit procédé ;

15 - des doses appropriées d'au moins une deuxième paire d'amorces appropriées, pour la réalisation de l'étape (c) dudit procédé ; et éventuellement

- des doses appropriées d'une sonde appropriée, pour la réalisation de l'étape (e) dudit procédé et/ou

20 - des doses appropriées d'au moins un composé se liant de manière non covalente sur un acide nucléique double brin tel que, notamment, une matière colorante ou un agent intercalant, apte à produire des modifications spectrales lorsqu'il est fixé sur un acide nucléique ou
25 lorsqu'il n'est pas fixé sur un acide nucléique.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de
30 la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

35 Dans les exemples qui suivent, les exemples 1 à 8 décrivent des modes de mises en oeuvre de l'hybrido

essai conforme à l'invention et les exemples 9 à 11 décrivent des modes de mise en oeuvre en phase homogène (détection en présence d'un agent intercalant).

I - Exemples du mode de mise en oeuvre en solution.

5

A) détection par composé radioactif :

Exemple 1 : Détection du virus de papillome humain de type 16 (HPV 16) à l'aide du procédé conforme à l'invention, utilisant deux amorces simples (As1 et As2) pour l'amplification d'enrichissement et une paire d'amorce Ad-Ac pour l'amplification de détection.

Lors de l'hybrido-essai conforme à l'invention, le nombre de cycles au cours de l'amplification d'enrichissement, la dilution et le nombre de cycles au cours de l'amplification de détection dépendent de la séquence cible à amplifier et à détecter de la dilution et de la nature de l'échantillon.

L'amplification d'enrichissement peut comprendre, à titre d'exemple non limitatif, entre 20 et 40 cycles, la dilution peut être comprise entre 1/200è et 1/100 000è et l'amplification de détection peut comprendre de 3 à 15 cycles ; en ce cas, les concentrations en amorce, lors de l'amplification de détection sont dix fois plus faibles que celles de l'amplification d'enrichissement, tout en obtenant dans le produit final un taux d'incorporation très élevé d'amorce (environ 75 %).

Un autre exemple de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention comprend deux séries d'amplification d'enrichissement qui peuvent, à titre d'exemple non limitatif, être envisagées comme suit :

- 1ère amplification d'enrichissement (10-40 cycles), dilution 1/200è ;
- 2ème amplification d'enrichissement à partir de la solution obtenue (10-40 cycles), dilution 1/1000è ;
- amplification de détection (3-15 cycles).

- Préparation du support :

Les supports utilisés ici sont des tubes en polystyrène à ailettes recouverts dans un premier temps par de la sérum-albumine-bovine (BSA) liée à de la biotine puis, dans un second temps, par de l'avidine.

5 g de BSA-biotine dans 500 μ l de tampon phosphate (0,05 M pH 7,3) sont incubés 2 heures à température ambiante dans les tubes à ailettes. Le liquide est vidé et remplacé par 500 μ l d'une solution d'avidine à 5 mg/ml dans le même tampon qu'on laisse incuber deux heures à température ambiante. Les sites libres du support sont ensuite bloqués par une solution à 20 μ g/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé et sonifié. Les tubes peuvent être conservés dans ce milieu plusieurs semaines à +4°C.

- L'amplification d'enrichissement :

La solution d'ADN à tester est soumise à la première amplification dans un milieu contenant un volume total de 50 μ l : 50 pmoles de chacune des deux amorces As1 et As2, 300 M de chacun des quatre désoxyribonucléosides triphosphates (c'est-à-dire dATP, dCTP, dGTP et dTTP) (Boehringer Mannheim), 1,5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,9, 0,01 % (P/V) de gélatine et 2,5 unités de Taq DNA polymérase (Amersham). Trente cycles d'amplification sont effectués grâce à un appareil automatique (un cycle correspondant à 90 s de dénaturation à 92°C, 90 s d'hybridation à 50°C et 120 s de polymérisation à 72°C).

- L'amplification de détection :

2 μ l de chaque échantillon préalablement amplifié dans un volume de 50 μ l sont dilués dans 400 μ l d'eau. 2 μ l de cette solution (soit un 1/5000e de l'amplification d'enrichissement) sont ensuite soumis à l'amplification de détection de 12 cycles en un volume total de 25 μ l dans le milieu d'amplification précédemment décrit en présence des amorces modifiées : soit 5 pmoles d'oligonucléotide biotinylé en 5' Ac3 et 5 pmoles

d'oligonucléotide Ad4 marqué en 5' par du ^{32}P , l'activité spécifique de ladite sonde étant volontairement limitée à 50 000 cpm/pmole ; l'activité totale par échantillon est de 250 000 cpm environ.

5 La figure 1 montre le principe du procédé décrit dans l'exemple 1. La paire d'amorces de l'amplification d'enrichissement est représentée par les amorces simples As1 et As2 ; la paire d'amorces de l'amplification de détection est représentée par les
10 amorces Ad4 marquées en 5' au ^{32}P et l'amorce Ac3 biotinylée.

- Fixation sur tube et détection de l'ADN produit :

La totalité des 25 μl issue de l'amplification
15 de détection est transférée dans un tube recouvert d'avidine contenant 475 μl de tampon de fixation ST (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM pH 9,5). La fixation se déroule en une heure à 50°C. Les tubes sont ensuite vidés et rincés par 1 ml de ST-Tween 20 à 1 %, une fois 5 min à température
20 ambiante, une fois 5 min à 50°C et une fois 5 min à 50°C par 1 ml de ST 0.1x-Tween 20 à 1 %.

La radioactivité fixée sur les tubes est ensuite comptée directement par effet Cerenkov. Les résultats sont exprimés par le rapport "R" de l'activité fixée
25 dans le tube sur l'activité totale de départ (soit 250 000 cpm environ).

Exemple 2 : Détection du virus du papillome humain de type 16 (HPV 16) à l'aide du procédé conforme à l'invention utilisant deux amorces simples As1 et As2
30 pour l'amplification d'enrichissement, une paire Ac3-As4 pour l'amplification de détection et une sonde Ad5 pour la détection.

On procède comme dans l'exemple 1 ; la différence porte sur la paire d'amorces de l'amplification de
35 détection et sur la détection.

L'oligonucléotide As4 n'est pas marqué est la révélation est assurée, après dénaturation de l'échantillon à 100°C, par une hybridation avec 0,1 pmole de sonde Ad5 (35-mer) marquée en 5' par du ^{32}P .
5 L'activité spécifique de la sonde est forte ($2,5 \cdot 10^6$ cpm/pmole) et l'activité totale par échantillon est de 250 000 cpm environ.

La sonde marquée Ad5 de révélation est ajoutée après transfert de la solution d'amplification de dé-
10 tection dans un tube recouvert d'avidine contenant 475 μl de tampon de fixation ST, comme précisé dans l'exemple 1.

Exemple 3 : Mise en évidence de l'ADN d'HPV 16 dans des biopsies suspectes du col de l'utérus.

L'ADN des biopsies est extrait classiquement
15 au phénol-chloroforme après lyse de la cellule et digestion des protéines (Maniatis et coll, Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Sur les 12 échantillons, 4 étaient fortement positifs ($R > 25\%$), 3 étaient positifs ($R > 10\%$) ; les négatifs gardant un bruit de fond très bas ($R < 1\%$) (R étant le rapport de l'activité fixée dans le tube sur l'activité totale de départ). Les valeurs issues de cette
20 technique conforme à l'invention sont corrélées avec les résultats obtenus par hybridation classique sur filtre, mais présentent, de manière inattendue, une sensibilité
25 nettement supérieure.

Exemple 4 : Mise en évidence d'HPV 16 dans des écouvillonnages vaginaux.

Les écouvillonnages vaginaux sont simplement
30 remis en suspension dans du PBS stérile puis centrifugés. Le culot est repris par 200 μl d'eau et porté à 100°C pendant 15 min. Le surnageant est récupéré et congelé à -20°C. Sur 8 échantillons traités selon le protocole précédemment décrit (exemple 1), un seul s'est révélé faiblement positif ($R = 2.5\%$), les autres ayant une activité comparable à celle des témoins négatifs ($R < 1\%$) ;
35

ces résultats étant toujours corrélés avec ceux issus de la technique d'hybridation sur filtre.

Exemple 5 : Utilisation d'une amorce marquée à l'iode¹²⁵

De l'ADN de cellules infectées par le virus HPV16 et de l'ADN de cellules non infectées, utilisé comme témoin négatif, ont été soumis à une amplification d'enrichissement selon le protocole décrit dans l'exemple 1.

Après dilution au 5000e, l'amplification de détection est effectuée en présence de l'amorce de capture Ac biotinylée et d'un oligonucléotide de détection Ad marqué à l'iode¹²⁵ en 5' selon la technique décrite dans le Brevet français 88 08240. Le marquage est limité volontairement à une activité spécifique faible (375 000 cpm/mole). La détection du duplex se déroule selon le protocole utilisé pour une amorce marquée au ³²P décrit dans l'exemple 1. Le double brin est fixé par la biotine sur le tube couvert d'avidine. Après rinçage, l'iode¹²⁵ est mesurée par un compteur gamma.

Résultats	Rendement de comptage R	(cpm fixés/cpm total)
T1 (+)	(ADN de biopsie HPV16 positif)	21,5 %
T2 (+)	(ADN de biopsie HPV16 positif)	16,5 %
T (-)	(ADN cellulaire HPV16 négatif)	0,4 %
Bruit de fond en absence d'ADN		0,04 %

B) Détection non-radioactive :

Exemple 6 : Révélation colorimétrique sur plaques de microtitration. Utilisation d'une amorce portant le groupement dinitrophényle.

5 De l'ADN de cellules infectées par le virus HPV16 et de l'ADN génomique sain ont été soumis à une amplification d'enrichissement, puis dilués selon le protocole décrit (voir exemple 1). L'amplification de détection est conduite en présence de l'amorce de capture Ac
10 biotinylée et d'une amorce Ad portant en 5' le groupement dinitrophényle introduit selon la technique décrit dans le Brevet français 88 08240. La détection du duplex comporte plusieurs étapes :

1. Incubation avec un anticorps antidinitrophényle issu du lapin (Sigma Chemical Co) dans un tampon
15 PBS (Phosphate Buffered Saline), Tween 20 1 %, BSA 1 % (Bovine Serum Albumine), 1 heure à 37°C.

2. Lavages par 3 x 400 µl de tampon PBS Tween
20 20 1 %, BSA 1 %, à température ambiante.

3. Incubation avec un anticorps dilué à 1/300e
20 antilapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma Chemical Co), dans le même tampon, 1 heure à 37°C.

4. Trois lavages avec du PBS, Tween 20 1 %, BSA 1 %, à température ambiante.

25 5. Révélation par hydrolyse du phosphate de dinitrophényle (kit Sigma). Lecture à 405 nm.

Résultats	DO	Signal/Bruit
T1 (+) (ADN de biopsie HPV16 positif)	2,6	21,6
5 T2 (+) (ADN de biopsie HPV16 positif)	1,9	15,8
T (-) (ADN de biopsie HPV16 négatif)	0,16	1,3
En absence d'ADN	0,12	1

10 Exemple 7 : Autres exemples de détection par le procédé en solution.

a) Amplifications :

Des extraits cellulaires bruts ont été préparés à partir de cellules Hela (HPV18 +) et de fibro-
15 blastes (HPV -) : après centrifugation, le culot cellulaire est repris par 250 µl d'eau et chauffé dix minutes à 100°C. On élimine les débris cellulaires par une courte centrifugation, et on récupère le surnageant qui contient les acides nucléiques solubles.

20 Une amplification d'enrichissement en HPV18 est effectuée dans un milieu PCR classique, en présence de 50 pmoles de chacune des amorces. Elle comporte 30 cycles : dénaturation 94°C 1 min 30, hybridation 50°C 1 min et élongation 72°C 1 min 30.

25 Une amplification de détection est conduite à partir d'une dilution au 1/800ème de la solution d'enrichissement. Cette amplification est effectuée avec deux amorces modifiées : la première comporte en 5' un résidu dinitrophényle, c'est l'amorce de capture, la
30 deuxième un résidu biotine, c'est l'amorce de détection. Le milieu d'amplification contient 5 pmoles de chaque amorce dans un volume total de 25 µl. Le nombre de cycles

est de 18 : dénaturation 94°C 1 min, hybridation 55°C 1 min et élongation 72°C 1 min.

b) Saturation des tubes :

Des tubes Nunc Startubes petit modèle sont recouverts avec des anticorps anti-DNP dans du tampon carbonate/bicarbonate de sodium 0,05 M, pH 9,5, MgCl₂ 1 mM, pendant une nuit à 37°C. Les sites libres sont ensuite saturés par une solution de BSA 2 % dans le même tampon pendant 3 heures à température ambiante. Les tubes sont ensuite lavés 5 minutes dans du PBS, et conservés dans ce même tampon à 4°C.

c) Fixation des produits d'amplification :

On fixe 15 µl des produits d'amplification de détection dans 500 µl de PBS pendant deux heures à 37°C. On effectue ensuite un lavage de 5 min dans 500 µl de PBS/BSA, 0,1 %/Tween 20 4 % puis deux lavages de 5 min dans du PBS.

On procède ensuite à une saturation courte de BSA (solution à 3 % dans du PBS) : une heure à 37°C. On lave 5 min avec du PBS.

On fait réagir la solution d'avidine-phosphatase alcaline (dilution au 1/12500ème dans du PBS). La fixation de ce complexe se fait en trente minutes à température ambiante. Elle est suivie par trois lavages de 5 min dans du PBS.

d) Détection par fluorescence :

Le substrat de la phosphatase alcaline utilisé est le 4-méthylumbelliféryl phosphate. A la suite de la coupure du phosphate par l'enzyme, le substrat devient fluorescent. La longueur d'onde d'excitation est de 374 nm et la longueur d'onde d'émission de la fluorescence est de 450 nm.

On prépare une solution stock de substrat 0,05 M dans du tampon TRIS 0,1 M, pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 5 mM. La solution de travail est obtenue par dilution au 1/300ème de la solution stock. On en utilise

500 μ l par tube. On laisse réagir l'enzyme 15 min puis on mesure la fluorescence bleue très intense.

Réglage du fluorimètre : 0 % sur le tampon
100 % sur l'ADN positif

5 Mesure de l'ADN négatif : 2 %

Mesure du blanc : 2 %

e) Détection par luminescence :

Le substrat de luminescence est un dérivé des dioxétanes : l'adamantyl-1,2-dioxétane phosphate. La luminescence est directement dépendante de l'action de l'enzyme : la coupure du phosphate provoque la formation d'un anion instable qui se scinde. Cette coupure crée un nouvel anion activé qui est responsable de la lumière émise.

15 On dispose d'une solution stock à 10 mg/ml. Cette solution est diluée 100 fois dans du tampon carbonate/bicarbonate de sodium 0,05 M, pH 9,5, $MgCl_2$ 1 mM. On en utilise 500 μ l par tube. On laisse réagir 10 min puis on mesure la lumière dans un luminomètre.

20 Signal de l'ADN positif : 245

Signal de l'ADN négatif : 4

Signal du blanc : 1,8

Cette méthode de détection atteint presque les valeurs de sensibilité des méthodes radioactives. Elle est une méthode de choix pour une détection non-radioactive.

f) Détection par colorimétrie :

Le substrat utilisé pour la phosphatase alcaline est le p-nitrophényl phosphate. La perte du phosphate par action enzymatique conduit à un composé jaune dont on mesure la densité optique à 405 nm.

On dissout deux pastilles de substrat phosphatase Sigma 104 dans 10 ml de tampon diéthanoline 0,8 M, $MgCl_2$ 5 mM, pH 9,8. On utilise 500 μ l par tube. On laisse réagir 10 minutes à l'obscurité, et on arrête la réaction par addition de 250 μ l de soude 2N.

Mesure de l'ADN positif : 0,32 O.D.

Mesure de l'ADN négatif : 0,02 O.D.

Mesure du blanc : 0,01 O.D.

II - Exemples du mode de mise en oeuvre en phase homogène.

Exemple 8 : Détection de l'ADN du virus de papillome humain de type 16 (HPV 16) à l'aide du mode de mise en oeuvre en phase homogène conforme à l'invention.

Les différentes solutions d'ADN à tester ont été soumises à une première amplification dans un milieu contenant en un volume total de 50 μ l : 50 pmoles de chacune des deux amorces A1 et A2, 200 μ M de chacun des quatre désoxyribonucléosides triphosphates (c'est-à-dire dATP, dCTP, dGTP et dTTP) (Boehringer Mannheim), 1,5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 0,01 % (P/V) de gélatine et 2,5 unités de Taq DNA polymérase (Amersham). Trente cycles d'amplification sont effectués grâce à un appareil automatique (un cycle correspondant à 90 s de dénaturation à 94°C, 90 s d'hybridation à 50°C et 120 s de polymérisation à 72°C).

1 μ l de chaque échantillon préalablement amplifié est dilué dans 100 μ l d'eau. 1 μ l de chaque solution (1/2 500^e) est ensuite soumis à une deuxième série d'amplifications de 15 cycles en un volume total de 25 μ l dans le milieu d'amplification précédemment décrit et contenant 5 pmoles des deux amorces B1 et B2.

A 20 μ l de solution d'amplification, on ajoute 1 μ l de bromure d'éthidium à 5 μ g/ml (soit 5 ng) ; on agite, puis on observe les tubes sous U.V., à 254 nm. Seules les solutions contenant de l'ADN viral de HPV16 émettent une fluorescence observable. Cela permet une discrimination rapide entre les échantillons positifs et négatifs.

Les résultats obtenus correspondent à ceux obtenus avec le gel de contrôle.

Exemple 9 : Détection d'ADN viral de HPV18 contenu dans un plasmide.

On prépare des dilutions successives d'ADN plasmidique de pBr322 contenant ou non l'ADN viral de HPV18. On obtient ainsi les concentrations de 20, 10, 1 et 0,1 ng d'ADN pour 1 µl.

Les huit solutions d'ADN ainsi obtenues sont soumises à amplification dans un volume de 25 µl contenant 3 pmoles de chacune des deux amorces A₁ et A₂, les quatre desoxyribonucléosides triphosphate (200 µM), du MgCl₂ 1,5 mM, du KCl 50 mM, du TRIS-HCl pH 8,3 10 mM, de la gélatine 0,01 % (p/v) et 0,25 unité de Taq DNA polymérase. Quinze cycles d'amplification sont effectués à l'aide d'un appareil automatique : dénaturation à 94°C pendant 1 minute 30, hybridation à 55°C pendant 1 minute 30 puis élongation à 72°C pendant 1 minute.

A la fin de ces quinze cycles, on ajoute dans chacun des tubes 1 µl de solution de bromure d'éthidium à 5 µg/ml (soit 5 ng), on agite rapidement puis on observe les tubes sur une table lumineuse UV 254 nm.

Les tubes contenant les solutions d'amplification de plasmide avec l'ADN viral (20, 10 et 1 ng) fluorescent nettement, celui contenant 0,1 ng de plasmide avec ADN viral fluoresce légèrement et ceux contenant le plasmide seul ne donnent aucun signal.

La détection au bromure d'éthidium du produit de l'amplification d'un ADN très purifié et très dilué est réalisée immédiatement après l'amplification et donne un résultat très significatif.

Exemple 10 : Autres exemples de détection en milieu liquide direct :

1) Utilisation d'un bis-benzimide (dénommé "HOECHST 33-258") :

a) détection de l'ADN du virus du HIV

(Syndrome de l'Immuno Déficience Acquise).

1 µl d'ADN provenant de lymphocytes ou monocytes de sujets sains ou porteurs du virus, de rate de sujet porteur du virus, de plasmide contenant un insert provenant de la souche HIV1/lav sont soumis à une amplification primaire, dans un volume de 50 µl, comme décrit dans l'exemple 1.

1 µl de chaque échantillon préalablement amplifié est dilué dans 200 µl d'H₂O. 2 µl de cette solution sont soumis à une deuxième amplification de 25 cycles dans un volume final de 25 µl avec les amorces B1 et B2.

20 µl de cette solution sont ensuite dilués dans 1 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 7,4 NaCl 2M contenant 1 µl final de HOECHST 33-258.

Après agitation, la fluorescence est mesurée dans un spectrifluorimètre Perkin Elmer LS5 (excitation 360 nm, émission 450 nm). L'appareil est préalablement étalonné avec différentes dilutions d'ADN double brin.

20 gamme étalon :

0,75 µg	0,35 µg	0,19 µg	0,01 µg	0 µg	ADN
100 %	30 %	15 %	9 %	0 %	

On utilise deux jeux de primers différents dans le gène tat et dans le gène pol de HIV1.

25

Résultats de pol :

	TEMOIN H ₂ O	LYMPHO+	LYMPHO-	RATE+	PLASMIDE +
SOLUTION	-	++	-	++	+++
FILTRE	-	++	-	++	+++

Résultats de tat :

	TEMOIN H ₂ O	LYMPHO+	LYMPHO-	MONO+	PLASMIDE +
SOLUTION	-	++	-	+	+++
5 FILTRE	-	++	-	-	+++

b) Détection de l'ADN du virus du Papillome Humain de types 16 et 18.

5 µl d'une solution de surnageant de cellules HPV 18+ (HELA) et HPV 16+ (CASKI), (10⁶ cellules dans 10. 250 µl d'H₂O), et de fibroblastes négatifs pour HPV, sont soumis à une amplification comme décrit précédemment. Après une dilution au 200ème, 2 µl sont soumis à une amplification secondaire et mesuré par fluorescence.

gamme étalon :

15 1,5 µg 0,75 µg 0,38 µg 0,19 µg 0,1 µg 0 µg ADN
100 % 48 % 20 % 8 % 2 % 0 %

HPV 16 :

	TEMOIN	FIBROBLASTES	CASKI
SOUTHERN	-	-	+++
20 SOLUTION	-	-	+++

HPV 18 :

	TEMOIN	FIBROBLASTES	HELA
SOUTHERN	-	-	+++
SOLUTION	-	-	+++

25

2) Utilisation du DAPI :

a) Détection de HPV 18 :

Même protocole que celui de l'exemple précédent ; on teste deux dilutions différentes : 1/50 et 1/200.

La fluorescence est mesurée dans un tampon Tris HCl 5 mM, pH 7,6, NaCl 8 mM, contenant 0,2 µg/ml de DAPI (excitation 372 nm, émission 454 nm).

gamme étalon :

5	1,5 µg	0,75 µg	0,38 µg	0,19 µg	0,1 µg	0 µg
	100 %	50 %	24 %	12 %	6 %	0 %

HPV 18 :

	TEMOIN	FIBROBLASTES
10 SOLUTION 1/200	++	-
SOUTHERN	++	-

b) Détection de HIV1 :

Même protocole que exemples précédents.

gamme étalon :

15	2 µg	1 µg	0,5 µg	0,25 µg	0,12 µg	0 µg
%	100	48	20	10	6	0

HIV1 :

	TEMOIN	LYMPHO+	MONO+	LYMPHO-	PLASMIDE+
20 SOUTHERN	-	++	-	-	+++
SOLUTION	-	++	+	-	+++

III - Rôle de l'étape (b) de dilution.

Des expériences préliminaires ont montré qu'une dilution au 1/10^e entraînent un bruit de fond important avec un signal bas après la liaison des hybrides à la matrice d'affinité et ce, indépendamment du nombre de cycles de la deuxième série d'amplifications. Ceci peut s'expliquer par le fait que la PCR est habituellement réalisée en présence d'un excès important d'amorces et qu'après une dilution au 1/10^e, la quantité d'amorces d'amplification encore présente en solution, est élevée. Au cours de la deuxième série

d'amplifications, il se produit alors une compétition entre les amorces d'amplification et les amorces de détection conduisant à une diminution de l'efficacité de la PCR. Des concentrations élevées en amorces peuvent également conduire à la formation d'amorces dimères.

La présence de débris cellulaires peut également conduire à une inhibition partielle de la réaction lorsque la PCR est réalisée sur des échantillons d'ADN brut et une dilution au 1/10^e n'est pas suffisante pour les éliminer. Les valeurs de bruit de fond sont obtenues en mesurant l'amplification de séquences non-spécifiques. Le signal spécifique est alors défini comme le nombre de coups d'une amplification spécifique après soustraction de la valeur de bruit de fond. On estime la sensibilité de la procédure par la mesure du pourcentage de fixation de signal spécifique. Les résultats sont représentés sur la figure 3. La sensibilité de détection est établie en fonction du nombre de cycles.

La figure 3 qui comporte en abscisse le nombre de cycles et en ordonnée le pourcentage de fixation montre des PCR réalisées sur des cellules HPV 18+ (Hela Δ , \square , \circ) et des cellules HPV 18- (BJAB, \blacksquare , \blacktriangle , \bullet). La première amplification est réalisée sur des cellules ($2 \cdot 10^4$) dans un volume de 100 μ l. Après une dilution au 1/10^e (\circ , \bullet), une dilution au 1/200^e (Δ , \blacktriangle) et au 1/2 000^e (\square , \blacksquare), les échantillons sont soumis à une deuxième amplification en présence d'une amorce marquée à l'iode 125 et d'une amorce biotinylée. Les hybrides sont récupérés et la radioactivité est mesurée. L'activité totale est de 71 000 cpm/tube, la valeur représentée est le pourcentage de radioactivité fixée.

Lorsque la dilution est portée respectivement au 1/200^e (Δ , \blacktriangle), et au 1/2 000^e (\square , \blacksquare), le nombre de copies de la séquence cible présentes au moment de la deuxième amplification sont initialement inférieures et entraînent une meilleure efficacité de la PCR. La phase

exponentielle est alors plus importante et le plateau est atteint après 20 et 25 cycles respectivement. En compensation le bruit de fond commence à augmenter exponentiellement après 16 et 20 cycles.

5. Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1*) Procédé de détection de séquences spécifiques d'acide(s) nucléique(s) (séquence unique et/ou mélange de séquences d'acides nucléiques) présente(s) dans un échantillon biologique, comprenant au moins une amplification enzymatique, caractérisé en ce qu'après mise en solution appropriée de l'échantillon biologique pour extraire le/les acides nucléiques, ledit procédé comprend la détection d'une séquence d'acide nucléique ou d'un mélange de séquences à l'aide des étapes suivantes :

(1) une étape d'enrichissement en séquence(s) cibles(s) par :

(a) mise en contact de l'échantillon biologique mis en solution, avec au moins une paire d'amorces appropriées, pour amplifier au moins un fragment de l'adn/lesdites séquences d'acide nucléique cible, lesdites amorces s'hybridant à ladite/lesdites séquences cibles et permettant d'obtenir une solution d'amplification d'enrichissement ; et

(b) au moins une dilution appropriée de la solution d'amplification d'enrichissement obtenue en (a) ;

(2) une étape de détection des séquences cibles amplifiées obtenues, par :

(c) mise en contact d'une fraction de la solution d'enrichissement obtenue en (b) avec au moins une paire d'amorces dont au moins l'une des séquences est incluse dans la séquence cible amplifiée en (a) ; et

(d) détection des copies d'acide nucléique cible double brin obtenues en (c), par tout moyen approprié.

2*) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les étapes (a) et (b) sont répétées au moins une fois.

3*) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la dilution de l'étape (b) est comprise entre 1/50e et 1/100 000e.

4*) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la dilution de l'étape (b) est comprise entre $1/50e$ et $1/50\ 000e$.

5*) Procédé selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce que la dilution de l'étape (b) est comprise entre $1/50e$ et $1/10\ 000e$, de préférence entre $1/200e$ et $1/5\ 000e$.

6*) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les amorces de l'étape (a) sont des séquences nucléotidiques simple brin (amorce simple (As)), qui s'hybrident à la séquence cible appropriée.

7*) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les amorces de l'étape (c) sont des paires choisies dans le groupe qui comprend les paires : amorce modifiée par un système de capture-amorce modifiée par un système de détection (Ac-Ad), les paires amorce simple-amorce simple (As1-As2), les paires amorce simple-amorce modifiée par un système de capture (As1-Ac), les paires amorce simple-amorce modifiée par un système de détection (As1-Ad).

8*) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la quantité d'amorces utilisée au cours de l'étape (c) (deuxième série d'amplifications) est nettement inférieure à la quantité d'amorces utilisée au cours de l'étape (a).

9*) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la quantité d'amorces utilisée au cours de l'étape (c) est au moins cinq fois plus faible que la quantité d'amorces utilisée au cours de l'étape (a).

10*) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que lorsque la paire d'amorces de l'étape (c) contient une amorce de capture, l'étape de détection (2) comprend :

(d) la mise en contact de la solution d'amplification de détection avec un support approprié qui capte les frag-

ments d'acides nucléiques porteurs de l'amorce de capture (Ac) intégrée ; et

(e) la révélation des copies d'acide nucléique cible double brin retenues sur ledit support, par tout moyen approprié.

11') Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que lorsqu'une amorce de détection (Ad) est intégrée dans un brin d'acide nucléique cible, au cours de l'étape (c), la détection de l'étape (e) est réalisée à l'aide de ladite amorce de détection (Ad).

12') Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que lorsqu'une amorce simple (As) est intégrée dans un brin au cours de l'étape (c), la révélation de l'étape (e) est réalisée soit par hybridation des copies d'acide nucléique cible double brin retenues sur le support avec une sonde de détection appropriée, soit par mise en contact avec un composé qui interagit avec l'acide nucléique double brin cible, notamment une matière colorante ou un agent intercalant apte à produire des modifications spectrales, puis détection desdites modifications spectrales du composé qui interagit avec l'acide nucléique double brin, par tout moyen approprié.

13') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que lorsque la paire d'amorces de l'étape (c) ne contient pas d'amorce de capture, l'étape de détection (2) comprend :

(d) la révélation directe en phase homogène liquide desdites séquences cibles amplifiées, par mise en contact des acides nucléiques double brin, obtenus après les étapes (a), (b) et (c) définies ci-dessus, soit avec une sonde de détection appropriée, soit avec un composé qui interagit avec un acide nucléique double brin, notamment une matière colorante ou un agent intercalant apte à produire des modifications spectrales puis détection desdites modifications spectrales du composé qui interagit.

avec l'acide nucléique double brin, par tout moyen approprié.

14*) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit composé est choisi parmi les substances présentant une modification physico-chimique après liaison avec l'ADN double brin.

15*) Procédé selon la revendication 13 ou la revendication 14, caractérisé en ce que le composé propre à produire des modifications spectrales est un agent intercalant fluorescent tel que, notamment, le bromure d'éthidium ou un bis-benzimide.

16*) Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que les dilutions successives d'un ADN à tester, et notamment d'un ADN viral à tester, sont soumises à une première série d'amplifications dans un volume convenable contenant au moins deux séquences cibles propres à servir de matrices, les quatre désoxyribonucléosides triphosphates, une quantité appropriée de Taq DNA polymérase, dans une solution tampon appropriée à pH 8,3 contenant une faible quantité (de l'ordre de 0,01 % p/v) de gélatine, les produits de la première série d'amplifications étant ensuite soumis à une deuxième étape de dilution, puis à une deuxième série d'amplifications dans un milieu d'amplifications qui est avantageusement similaire à celui mis en oeuvre dans la première série d'amplifications et qui contient au moins deux séquences cibles propres à servir de matrices, après quoi le composé propre à produire des modifications spectrales est ajouté à la solution d'amplifications obtenue à la suite de la deuxième série d'amplifications pour révéler l'ADN viral double brin éventuellement présent dans les solutions.

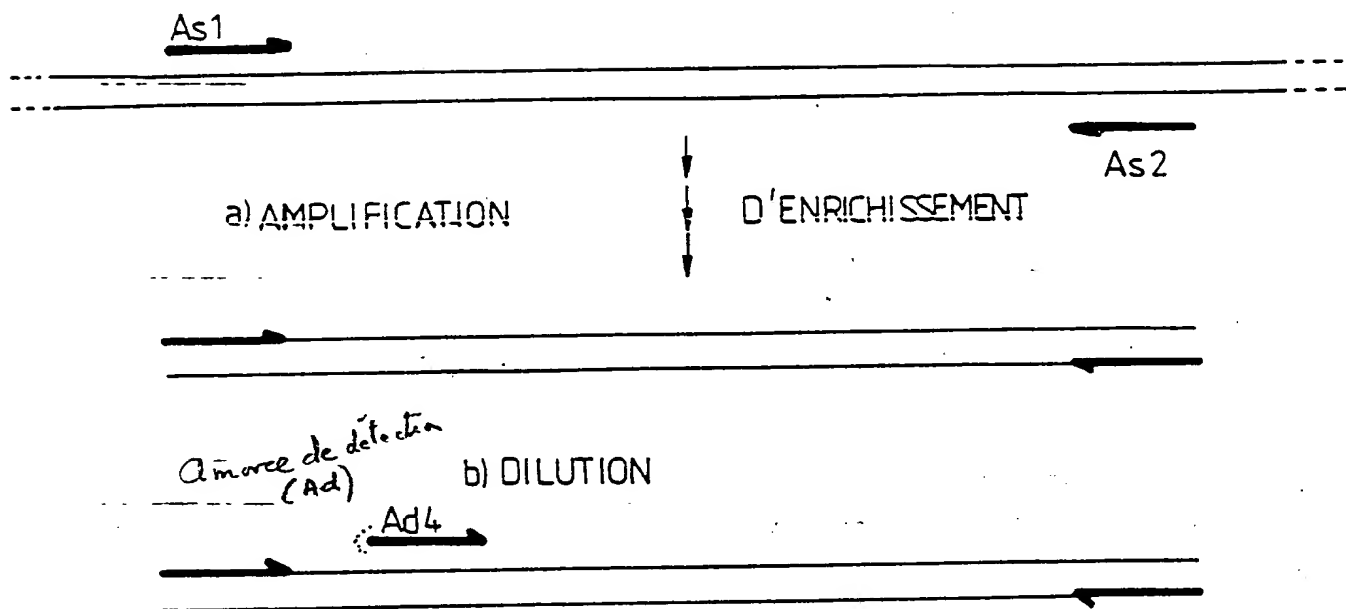
17*) Coffret, kit ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce

qu'outre des quantités utiles de tampons et de réactifs appropriés pour la mise en oeuvre de ladite détection, il comprend au moins :

- des doses appropriées d'au moins une première paire d'amorces appropriées, pour la réalisation de l'étape (a) dudit procédé ;
- des doses appropriées d'au moins une deuxième paire d'amorces appropriées, pour la réalisation de l'étape (c) dudit procédé ; et éventuellement
- 10 - des doses appropriées d'une sonde appropriée, pour la réalisation de l'étape (e) dudit procédé et/ou
- des doses appropriées d'au moins un composé se liant de manière non covalente sur un acide nucléique
- 15 double brin tel que, notamment, une matière colorante ou un agent intercalant, apte à produire des modifications spectrales lorsqu'il est fixé sur un acide nucléique ou lorsqu'il n'est pas fixé sur un acide nucléique.
- 18*) Application du procédé selon l'une quel-
- 20 conque des revendications 1 à 16, à la détection des maladies génétiques tant humaines, animales que végétales.
- 19*) Application du procédé selon l'une quel-
- 25 conque des revendications 1 à 16, à la détection des maladies infectieuses tant humaines, animales que végétales.
- 20*) Application du procédé selon l'une quel-
- conque des revendications 1 à 16, à la détection des maladies tumorales tant humaines, animales que végétales.
- 30 21*) Application du procédé selon l'une quel-
- conque des revendications 1 à 16, au contrôle des échantillons biologiques.
- 22*) Application du procédé selon l'une quel-
- conque des revendications 1 à 16, au typage cellulaire.

FIG.1

1) Etape d'enrichissement



2) Etape de détection

c) AMPLIFICATION

DE DETECTION

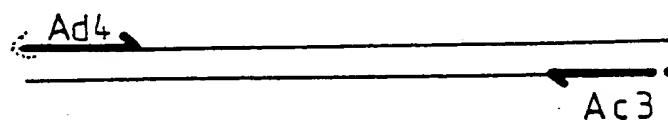
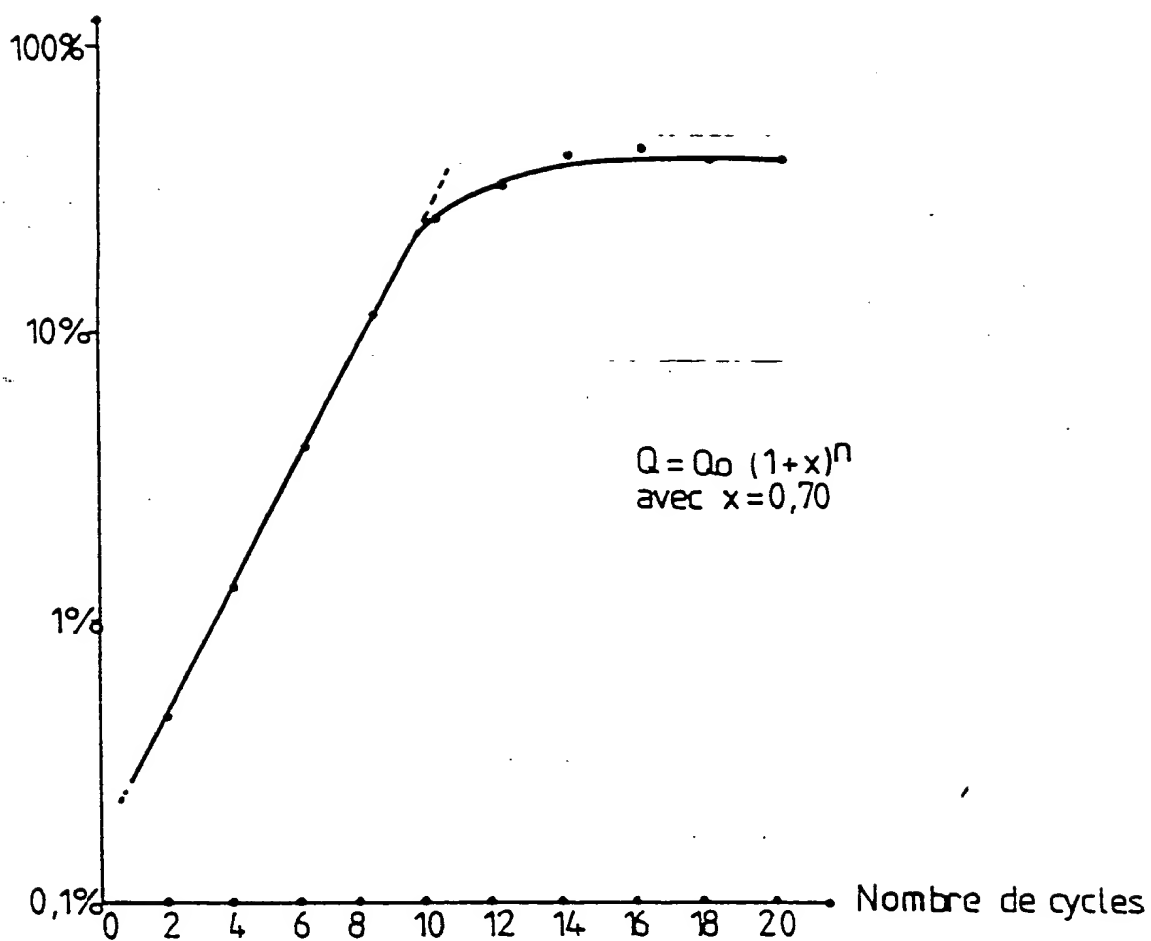
d) FIXATION et
e) REVELATION

FIG. 2CINETIQUE D'AMPLIFICATION DE DETECTION

5/3

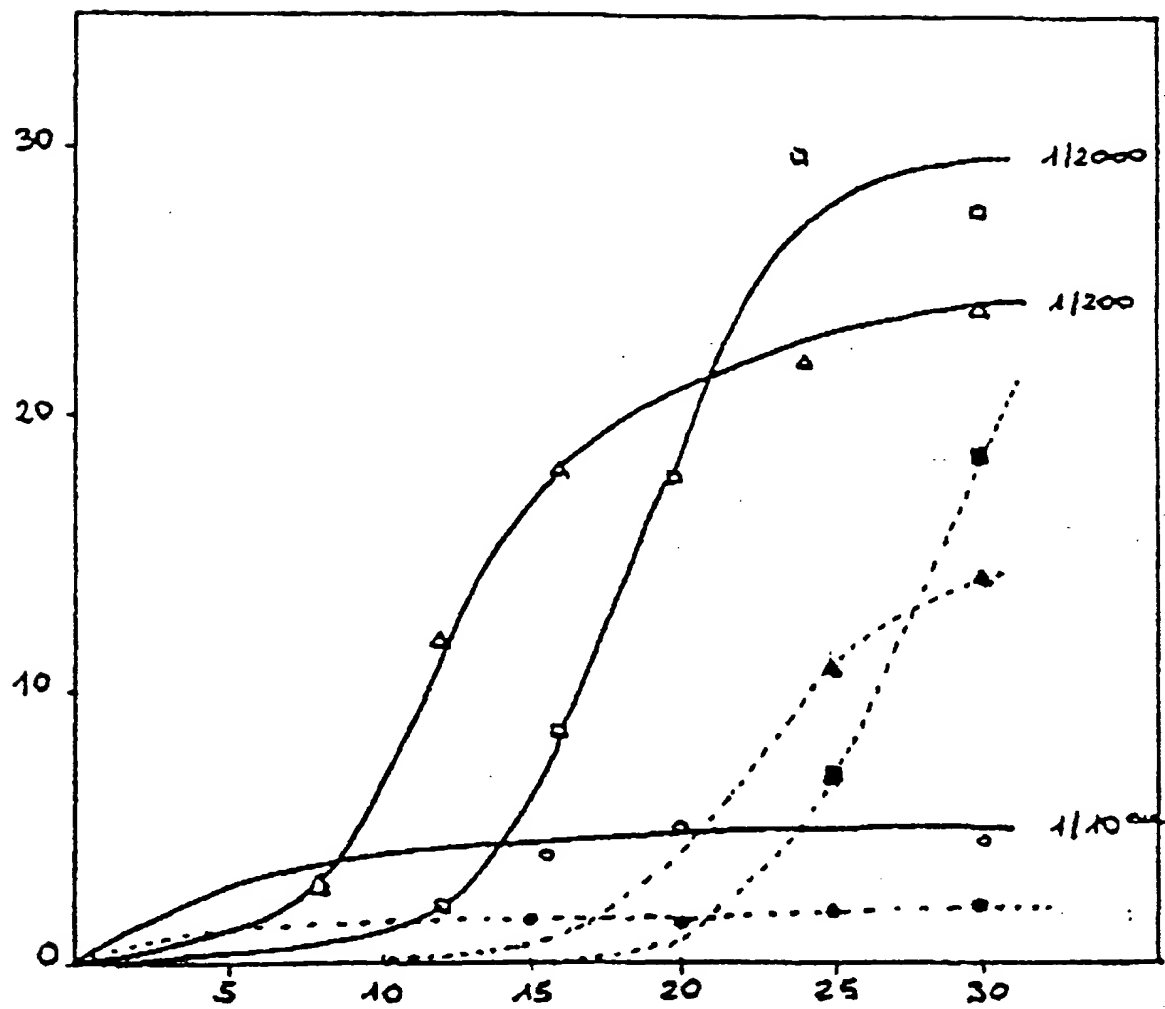


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. **PCT/FR 90/00410**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC ⁵ C 12 Q 1/68, G 01 N 33/531		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ⁵	C 12 Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation -- to the extent that such documents are included in the fields searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁸		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	Nucleic Acids Research, Vol. 17, No. 7, April 1989, IRL Press, H. Voss et al.: "Direct genomic fluorescent on-line sequencing and analysis using in vitro amplification of DNA", pages 2517-2527 see the whole article ---	1,7,10-20
Y	EP, A, 0297379 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) 4 January 1989 see abstract; column 6; example 4 ---	1,7,10-20
Y	GB, A, 2202328 (ORION-YHTYMA OY) 21 September 1988 see the whole document ---	1,7,10-20
P,Y	EP, A, 0328829 (AMOCO CORPORATION) 23 August 1989 see the whole document ---	1,7,10-20
Y	US, A, 4824776 (HELLER) 25 April 1989 see the whole document ---	1,7,10-20
./.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
14 September 1990 (14.09.90)		15 October 1990 (15.10.90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, January 1988, D.R. Engelke et al.: "Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA", pages 544-558 see the whole article, in particular pages 545-546	1,7,10-20
Y	EP, A, 0310229 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LEYLAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 5 April 1989 see page 6, lines 10-32	1,7,10-20
Y	EP, A, 0231495 (ENZO BIOCHEM., INC.) 12 August 1987 see pages 13,14,35,36	13-20
Y	WO, A, 8401174 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 29 March 1984 see page 7, lines 10-15	13-20
Y	US, A, 4257774 (RICHARDSON et al.) 24 March 1981 see the whole document	13-20

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. D.

FR 9000410

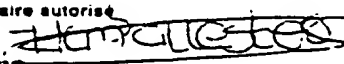
SA 37956

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 08/10/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0297379	04-01-89	JP-A- 1098499	17-04-89
GB-A- 2202328	21-09-88	AU-A- 1193788	15-09-88
		DE-A- 3807994	22-09-88
		FR-A- 2613077	30-09-88
		JP-A- 63243875	11-10-88
		LU-A- 87153	23-08-88
		NL-A- 8800594	03-10-88
		SE-A- 8800864	12-09-89
EP-A- 0328829	23-08-89	AU-A- 2735988	13-07-89
		JP-A- 1211500	24-08-89
US-A- 4824776	25-04-89	None	
EP-A- 0310229	05-04-89	AU-A- 2318188	01-03-89
		WO-A- 8901050	09-02-89
EP-A- 0231495	12-08-87	JP-A- 62163699	20-07-87
WO-A- 8401174	29-03-84	EP-A- 0119209	26-09-84
US-A- 4257774	24-03-81	None	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00410

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : C 12 Q 1/68, G 01 N 33/531		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 12 Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	Nucleic Acids Research, volume 17, no. 7, avril 1989, IRL Press, H. Voss et al.: "Direct genomic fluorescent on-line sequencing and analysis using in vitro amplification of DNA", pages 2517-2527 voir l'article en entier --	1,7,10-20
Y	EP, A, 0297379 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) 4 janvier 1989 voir l'abrégé; colonne 6; exemple 4 --	1,7,10-20
Y	GB, A, 2202328 (ORION-YHTYMA OY) 21 septembre 1988 voir le document en entier --	1,7,10-20
P,Y	EP, A, 0328829 (AMOCO CORPORATION) 23 août 1989 voir le document en entier -- ./.	1,7,10-20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
14 septembre 1990	15. 10. 90	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 H. Ballesteros	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIOUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)

Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
Y	US, A, 4824776 (HELLER) 25 avril 1989 voir le document en entier	1,7,10-20
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 85, janvier 1988, D.R. Engelke et al.: "Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA", pages 544-558 voir l'article en entier, en particulier pages 545-546	1,7,10-20
Y	EP, A, 0310229 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LEYLAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 5 avril 1989 voir page 6, lignes 10-32	1,7,10-20
Y	EP, A, 0231495 (ENZO BIOCHEM., INC.) 12 août 1987 voir pages 13,14,35,36	13-20
Y	WO, A, 8401174 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 29 mars 1984 voir page 7, lignes 10-15	13-20
Y	US, A, 4257774 (RICHARDSON et al.) 24 mars 1981 voir le document en entier	13-20

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9000410

SA 37956

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08/10/90

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0297379	04-01-89	JP-A- 1098499	17-04-89
GB-A- 2202328	21-09-88	AU-A- 1193788	15-09-88
		DE-A- 3807994	22-09-88
		FR-A- 2613077	30-09-88
		JP-A- 63243875	11-10-88
		LU-A- 87153	23-08-88
		NL-A- 8800594	03-10-88
		SE-A- 8800864	12-09-89
EP-A- 0328829	23-08-89	AU-A- 2735988	13-07-89
		JP-A- 1211500	24-08-89
US-A- 4824776	25-04-89	Aucun	
EP-A- 0310229	05-04-89	AU-A- 2318188	01-03-89
		WO-A- 8901050	09-02-89
EP-A- 0231495	12-08-87	JP-A- 62163699	20-07-87
WO-A- 8401174	29-03-84	EP-A- 0119209	26-09-84
US-A- 4257774	24-03-81	Aucun	